碳酸酐酶（Carbonic Anhydrase，CA）试剂盒说明书

微量法 100 管/96 样

正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

测定意义：

碳酸酐酶(Carbonic Anhydrase，CA)是一种含锌金属酶，迄今在哺乳动物体内已发现至少有11种同工酶，它们的结构、分布、性质各异，多与各种上皮细胞泌H-和碳酸氢盐有关，通过催化CO2水化反应及某些脂、醛类水化反应，参与多种离子交换 ，维持机体内环境稳态。

测定原理：

碳酸酐酶具有酯酶活性，可催化乙酸对硝基苯酯反应生成对硝基苯酚，通过检测 405nm 处吸光值上升速率反映碳酸酐酶活性。

需自备的仪器和用品：

酶标仪、水浴锅、可调式移液器、96 孔板、研钵、冰和蒸馏水。

试剂的组成和配制：

提取液：液体 100mL×1 瓶，4℃保存；

试剂一：液体 20mL×1 瓶，4℃保存；

试剂二：粉剂×1 瓶，-20℃避光保存；临用前加入 5mL 试剂三，充分溶解待用，用不完的试剂继续-20℃避光保存。**(注意：试剂二为微量粉剂可能肉眼看不见，正常溶解即可）**

试剂三：液体 6mL×1 瓶，4℃保存。

样品测定的准备：

1、细菌或细胞的处理：收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；按照细菌或细胞数量（10^4个）：提取液体积（mL）为 500~1000：1 的比例（建议 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液），超声波破碎细菌或细胞（冰浴，功率 20%或 200W，超声 3S，间隔 10S，重复 30 次）；8000g，4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

2、组织的处理：按照组织质量（g）：提取液体积(mL)为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液），冰浴中匀浆。8000g ，4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

测定步骤

1、酶标仪预热 30min，调节波长至 405nm。

2、试剂一、试剂二提前 25℃预热 10min。

3、取 96 孔板，依次加入 20μL 样本上清，140μL 试剂一，最后加入 40μL 试剂二。立刻混匀，测定 405nm 下 3min 处吸光值 A1 与 6min 处吸光值 A2，ΔA=A2-A1

CA 活力计算：

标准条件下测定回归方程为 y = 1.0424x + 0.001，R2 = 0.9994；x 为标准品浓度（μmol/mL），y 为吸光值。

1、按照蛋白浓度计算

单位的定义：每 mg 组织蛋白每分钟催化产生 1nmol 对硝基酚定义为一个酶活力单位。

CA 活性(nmol/min/mg prot)=(ΔA-0.001) ÷1.0424×V 样÷(V 样×Cpr)÷T×1000

=319.77×(ΔA-0.001) ÷Cpr

2、按样本鲜重计算

单位的定义：每 g 组织每分钟催化产生 1nmol 对硝基酚定义为一个酶活力单位。

CA 活性(nmol/min/g 鲜重)=(ΔA-0.001) ÷1.0424×V 样÷(W ×V 样÷V 样总)÷T×1000

=319.77×(ΔA-0.001) ÷W

3、按细菌或细胞密度计算

单位的定义：每 1 万个细菌或细胞每分钟催化产生 1nmol 对硝基酚定义为一个酶活力单位。

CA 活性(nmol/min/10^4 cell)=(ΔA-0.001) ÷1.0424×V 样÷(500 ×V 样÷V 样总)÷T×1000

=0.639×(ΔA-0.001)

V 样：加入样本体积：0.02mL；V 样总：加入提取液体积，1 mL；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g；500：细菌或细胞总数，500 万；T：反应时间，3min；1000，μmol 到 nmol 的换算系数。